

Translation of portions of JP-61-18721

The invention's anti-tumor substance can be obtained from culture preparation of tumorigenic human fibroblasts.

As such tumorigenic human fibroblasts, suitable examples thereof are cells (referred to as "SV40 transformant cells") obtained by transforming with SV40, the human embryo fibroblasts described in Yanagisawa K. et al., in Journal of University of Occupational and Environmental Health (referred to simply as "UOEH" hereinafter) 5. 49 (1983) by method of Gotoh et al., J. Gen. Virol. 42:409-411 (1979)).

The cell culture can be conducted according to the method described in UOEH 5. 49 (1985).

The collection of the invention's anti-tumor substance from the culture preparation can be carried out in a manner described below.

To the culture supernatant whose cells have been rendered confluent, 1-3 times amount of cold saturated ammonium sulfate solution (pH 7-8) is added. The resultant mixture is left still at 1 to 10°C for from 10 minutes to 2 hours. Then, this is subjected to a centrifugal separation under cooling at 10,000 to 20,000 rpm. Then, the resultant precipitate is dissolved in 1 to 20mM of phosphate buffer, NaCl (pH 7.2, to be referred to as PBS hereinafter) and subjected to a column chromatography with Sephadex G100 to effect elution and fractionation with the PBS subsequently thereto. Each fraction is evaluated on the incorporation activity of [3H] thymidine into 3T3 fibroblasts (believed to be proportional to the DNA synthesizing activity).

The cell is subjected to Sephadex G1.00 column chromatography and on fractions having the [3H] thymidine incorporation promoting activity, a dialysis with 1 to 100 mM phosphate buffer (pH 7-8) is effected and then subjected to DEAE Sephadex A-25 column chromatography and then eluted with PBS and fractionation. The resultant [3H] thymidine incorporation restrictive fraction is further subjected to the Sephadex G100 column chromatography like the case described above. At the position of 10,000 Dalton molecular weight, [3H] thymidine incorporation restrictive activity is observed. The active fractions are collected and then dry-frozen, whereby the invention's anti-tumor substance is collected. This anti-tumor substance of the invention has been named FNF (fibroblast-originating necrotic factor). The FNF can be classified into I, II and III according to the NaCl concentration of the elution liquid.

⑤ 日本国特許庁 (J.P.) ⑥ 特許出願公開
⑦ 公開特許公報 (A) 昭61-18721

⑧ Int. Cl. 4 識別記号 庁内整理番号 ⑨ 公開 昭和61年(1986)1月27日
A 61 K 35/12 ADU 7138-4C
37/04 7138-4C
審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑩ 発明の名称 新規抗腫瘍性物質

⑪ 特 願 昭59-140368

⑫ 出 願 昭59(1984)7月6日

⑬ 発 明 者 岡 井 康 二 町田市中町3-9-11

⑭ 出 願 人 協和発酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明 細 書

1. 発明の名称

新規抗腫瘍性物質

2. 特許請求の範囲

- (1) 調製したヒト癌細胞より生産され、分子重量1万の糖蛋白質であり、抗腫瘍活性を有する新規抗腫瘍性物質。
(2) 癌細胞の細胞死因子 FNF I, II または III である特許請求の範囲第1項記載の新規抗腫瘍性物質。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明物質は、抗腫瘍性を有する医薬用物質として利用することができる。

従来の技術

従来、抗腫瘍性物質としては抗生物質、核酸誘導物質、蛋白質性物質などが知られている。

ヒト癌細胞が生産する抗腫瘍性物質としては特願昭59-18423号公報に記載のヒト腫瘍細胞死因子 (TDF) が知られている。

発明が解決しようとする課題

従来の抗腫瘍性物質は、細胞の核酸合成を抑制するという性質を有しているが、正常細胞と腫瘍

細胞との両方に抑制が起こり、抗腫瘍剤としての使用は困難である。

正常細胞には作用せず、腫瘍細胞のみに抑制効果がある抗腫瘍性物質の開発が望まれている。

課題を解決するための手段

一般に腫瘍細胞は、正常細胞に比べその増殖能が高く、無限に近い速度に増えると言われている。しかし実際に試験管内 (in vitro) での腫瘍細胞の増殖において腫瘍細胞は無限には増殖しない。とくに腫瘍細胞の細胞密度が高くなると培養液中の栄養状態を改善しても細胞数は増加せず、腫瘍細胞は一定の割合で死滅する。

腫瘍細胞の増殖を促進する原因物質としてトランスフォーミング・グロース・ファクター [Transforming growth factor (TGF), De Larco & Todaro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4001-4005 (1978), Marquardt & Todaro, J. Biol. Chem. 257, 5220-5225 (1982), Roberts et al., Nature 295, 417-419 (1982)] が知られている。この TGF は腫瘍細胞自身から生産され、その TGF が腫瘍細胞自身の TGF に対するレセプターに反応すると報告されている。

TGF が腫瘍細胞から生産され、さらに自身の TGF 産生を活性化するのであれば、腫瘍細胞は

細胞に増殖するはずである。しかし上記のごとく、腫瘍細胞はin vitroで無限に増えない。

本発明者らは、腫瘍細胞が生産する物質について研究した結果、腫瘍細胞はTGFととも抗腫瘍性物質をも生産していることを見出した。

特開昭59-88423 記載のTGFはヒト胎児の正常細胞培養液から得られるものであり、本発明の物質とは配量が異なり、さらに生物学的性質、理化学的性質においても本発明物質とは差異が認められるので、別の物質である。

作 用

本発明の抗腫瘍性物質は、腫瘍化したヒト繊維芽細胞の培養液から採取することができる。

腫瘍化したヒト繊維芽細胞としては、Terasaki K. et al., Journal of University of Occupational and Environmental Health (以下UOEHと略記する) 5, 49(1988) に記載のヒト胎児繊維芽細胞(YH cell)をGotshらの方法[Gotsh et al., J. Gen. Virol. 42, 408-414(1979)]によりSV40で形質転換した細胞(以下SV40形質転換細胞という)が好適な例として用いられる。

細胞の培養は、UOEH 5, 49(1988)に記載の方法に従って培養することができ、具体例は実施例に示す。SV40形質転換細胞は1:5でバ

メンブレンフィルターを脱脂後、トルエン系シンチラントの入ったガラスびんに入れてβ線測定用ベータマンシンチレーションカウンターでメンブレンフィルターに取り込まれた放射線活性を測定する。

セファデックスG100カラムクロマトグラフィーにかけ[³H]チミジン取り込み促進活性を有する成分について、1~100 mMリン酸バッファー(pH 7~8)で透析を行い、DEAEセファデックスA-25カラムクロマトグラフィーにかけPBSで溶出、分画する。得られる[³H]チミジン取り込み抑制活性成分をさらに上記と同様にセファデックスG100カラムクロマトグラフィーにかけ、分子重約1万ダルトンの位置に[³H]チミジン取り込み抑制活性が認められる。活性成分を集め凍結乾燥することにより本発明抗腫瘍性物質を採取することができる。本発明の抗腫瘍性物質を繊維芽細胞由来壊死因子(fibroblast-derived necrosis factor, FNF)と命名した。抽出液のNaCl濃度によりFNFはI, II, IIIに分けられる。FNFの理化学的ならびに生物学的性質は実施例中に示す。

実施例1

本発明抗腫瘍性物質の製造:

特開昭61-18721(2)

パッセージ(passage)する。細胞は4日間で行わゆるコンフルエント(confluent)の状態になる。

培養液からの本発明抗腫瘍性物質の採取は、次のようにして行うことができる。

コンフルエントの状態になった細胞の培養液に1~8倍量の冷媒と塩酸(pH 7~8)を加え、1~10℃で10分~8時間放置し、1万~2万rpmで10~20分間冷凍离心を行う。その沈降を1~20 mMのリン酸バッファー・NaCl(pH 7.2, 以下PBSと略記する)に溶かし、セファデックスG100カラムクロマトグラフィーにかけ、PBSで溶出し、分画する。

各画分のST3細胞芽細胞に対する[³H]チミジン取り込み活性(DNA合成活性に比例すると考えられる)を測定する。具体的には、ST3細胞芽細胞(1×10⁴細胞)を0.1 mlのRPMI 1640培養液(0.4%仔牛胎児血清(以下FCSと略記する、Gibco社製)を含む)に懸濁し、各画分0.1 mlを加える。5%CO₂, 85%空気、37℃の条件で16時間培養後、1 μCiの[³H]チミジン(5 Ci/mM, Amersham社, 英国)を加え、さらに8時間培養する。セルハーベスターを用い、細胞をGF/Cメンブレンフィルター(Whatman社)にトラップし、水でよく洗う。

ヒト胎児繊維芽細胞[UOEH 5, 49(1988)] YH cell)をGotshらの方法[Gotsh et al., J. Gen. Virol. 42, 408-414(1979)]によりSV40で形質転換した細胞をイーグル(Eagle)のMEM培養液に10%のFCSを加えた培地で37℃、4日間培養し、コンフルエントの状態にした。

培養液約8.5 mlに2倍量の冷媒と塩酸(pH 7.5)を加え、4℃で1時間放置し、15,000rpmで15分間离心分画にかけた。この沈降を100 mMリン酸バッファー・NaCl(PBS)(pH 7.2) 5 mlに溶かし、セファデックスG100カラム(1.8×48 cm)クロマトグラフィーにかけ、PBSで溶出した。抽出液は5 mlずつに分画採取した。

セファデックスG100カラムクロマトグラフィーの画分について、前記チミジン取り込み活性を測定した。結果は第1図に示すとおりでボイドボリューム(Void volume)の位置に小さな取り込み促進活性、分子重4万~7万ダルトンと約1万ダルトンの位置に大きな取り込み促進活性が認められた。

対照として、イーグルのMEM培地に10%のFCSを加えた培地を上記と同様にセファデックスG100カラムクロマトグラフィーにかけ、分

特開2001-18721(9)

面、活性測定を行ったところ、第3図に示す結果を得た。この場合は、4万〜7万ダルトンの位置に比較的広いチミジン取り込み活性のピークが認められた。

これらの結果から、分子重約1万ダルトンの位置にある活性物質が、SV40形質転換細胞により製造されたことがわかる。

分子重約1万ダルトンの活性物質を含む画分(分画番号18〜21)を10mMリン酸バッファー(pH7.4)で透析後、DEAEセファデックスA-25カラム(1.2×10cm)クロマトグラフィーにかけた。溶出は、10mMリン酸バッファー(pH7.4)に第3図に示す濃度のNaClを含む溶液で行った。溶出液は0.5mlずつに分画採取し、³Hチミジンの取り込み活性を測定した。結果を第3図に示す。その結果、いくつかの促進活性とともに非常に強いチミジン取り込み抑制活性がNaCl150mMの位置に存在することを見出した。3T3細胞培養細胞にこの抑制活性を有する画分を加え、細胞を光学顕微鏡で見ると、完全な形態をした細胞はほとんど見られず、細胞数も第4図に示すごとく激減していた。このことは、チミジン取り込み能の減少が、単なるDNA合成の抑制によるものではなく、細胞自身

の破壊による細胞数の減少によるものであることを示している。

さらに、上記DEAEセファデックスA-25カラムクロマトグラフィーの分画について、SV40形質転換細胞を標的細胞として³Hチミジン取り込み活性を測定した。その結果、第5図に示すごとく、50mM NaCl、150mM NaClおよび300mM NaClの位置にチミジン取り込み抑制活性が存在することを見出した。

50mM、150mM、300mMのNaClで溶出される画分に含まれる物質をそれぞれ繊維芽細胞由来壊死因子(fibroblast-derived necrosis factor) (FNF) I、II、IIIとそれぞれ命名した。

これらFNFは、SV40形質転換細胞を破壊し、細胞数を減少させた。これらFNFは、上記画分から凍結乾燥法によって採取できる。

各種培養細胞の³Hチミジン取り込み活性に対するFNF I、IIおよびIIIの効果を調べた結果を第1表に示す。

第1表 各種細胞に対するFNFの効果

細胞	[³ H]チミジン取り込み		
	I	II	III
YH (ヒト胎児繊維芽細胞)	+	++	++
SV形質転換YH	+	++	++
PC10 (上皮性癌)	+	++	++
SK28 (メラノーマ)	+	++	++
KB (カルシノーマ)	+	++	++
FlowT000 (ヒト繊維芽細胞)	+	+	+
K562 (ヒト白血病細胞)	+	+	+

細胞	[³ H]チミジン取り込み		
	I	II	III
LB28 (ネズミ繊維芽細胞)	+	-	+
3T3細胞培養細胞	+	++	-
MR90 (ヒト繊維芽細胞)	+	+	-
L133 (ヒト胎児肝)	-	+	++
T8M1 (カルシノーマ)	-	+	+
Kaperva (ヒト肝臓細胞)	+	-	+
KISH (ヒト羊水細胞)	-	-	-
ネズミ正常肝臓細胞	-	-	-

++ 極めて強い抑制活性あり。
 + 一定の抑制活性あり。
 - 有意な抑制活性が認められない。

この結果、FNF IIとIIIは、Iに比べて強い活性を示し、とくにSV40形質転換YH、YH、PC10、SK28およびKBに対しては強い活性を示す。胎児の細胞であるYHに対して効果があることは、癌細胞と胎児細胞の共通抗原をこれらの因子が認識している可能性を示唆している。

第5図のFNF II、IIIを含む画分をそれぞれPBSで透析し、ConAセファロースカラム(5ml)にかけ、PBSで洗い、α-メチルマンノシド0.2Mを含むPBSで溶出した。その結果、FNF IIおよびIIIはConAセファロースに吸着した(第12図および第13図)。

このことは、これらが糖を含むことを示している。ConAセファロースカラムで精製したFNF IIは、DEAEセファロースA-25カラムで部分精製したものに比べ完全に直線的な投与量反応曲線(dose response curve)を示した(第8図b)。

このことは、FNF IIがConAセファロースカラムにより高度に精製されたことを示している。DEAEセファデックスA-25カラムによる精製では、直線的な関係が得られなかった(第8図a)のは、試料中にTGF活性物質が混在していることを示している。

FNF I、II、IIIの物理化学的、生化学的性質

を第2表に示す。

第2表 PNFの物理化学的、生化学的性質

		〔 ³ H〕チミジン取り込み (CPM)		
		I	II	III
肝臓		5820	5288	6007
+ PNF		156	87	58
細胞理	58℃, 1時間	183	49	82
	80℃, 1時間	281	36	93
pH安定性	pH 4.0, 1時間	173	59	54
	pH 9.5, 1時間	208	88	60

		〔 ³ H〕チミジン取り込み (CPM)		
		I	II	III
RHase A (50 μg/ml)	37℃, 1時間	801	102	128
DHase I (50 μg/ml)	37℃, 1時間	185	114	212
トリプシン (50 μg/ml)	37℃, 1時間	580	421	303
ヤブエの融合リポソーム (50 μg/ml) 27℃, 1時間		3820	2888	3454

* 表中のCPMは、SV40形変換細胞の〔³H〕チミジン取り込み活性を3回測定したものの平均値を示す。

PNF I, II, IIIは、酸に安定であり、酸性、塩基性の条件下でも安定である。RHase A, DHase

すなわち、第2図に示すごとく、新しいMEM培地(10% FCSを含む)は、3T3細胞芽細胞に対するDNA合成活性を有しているが、SV40形変換細胞に対しては細胞増殖活性を示さない。このとき培地を交換しないでそのままにしておくと細胞は増殖を開始し、2日後にセミコンフルエント(semi-confluent)、4日後にコンフルエント(confluent)の状態になる。1日目に培地を交換して、2日目以前に調製したSV40形変換細胞の培養上清を50% (V/V) 入れると、細胞は2日目から増殖を開始する。この結果は、SV40形変換細胞が増殖するのに必要なTCFを産生するには、1日では不十分で、2日間を必要とすることを意味している。また増殖を開始するTCFはある一定以上の量を必要とすることを示している。

PNFがTCFの存在下では活性を顕現できないということから推測して、癌細胞をパッセージ(passage)した後の比較的初期、1日目までに加えるとその効果を示すと考えられる。

第9図は、SV40形変換細胞(ヒト胎児癌細胞)をパッセージ(passage)した直後(黒丸)、1日後(白丸)にPNF IIを加えると癌細胞の増殖抑制効果が認められるが、2日後(△印)

特開昭61-18721(4)

Iでは活性に顕著なく、トリプシンにより若干の影響が見られ、グリコシダーゼによりかなり影響を受けた。

この結果、PNF I, II, IIIは糖と蛋白質を含み、主要な活性は糖部分に存在することがわかる。

第1図のセファデックスG100カラムクロマトグラフィーでは、〔³H〕チミジン取り込み活性の促進活性のみが見出され、抑制活性は見出されていない。一方PNF IIを第1図と同じ条件でセファデックスG100カラムクロマトグラフィーにかけたところ、第7図に示したとおり分子量約1万ダルトンの位置に明らかな抗腫瘍活性が存在することが認められた。このことは、第1図のクロマトグラフィーでは、抗腫瘍活性物質が存在するにもかかわらず、ほぼ同じ分子量のTEPが存在するために抗腫瘍活性が見出されなかったことを意味している。

第8図に、SV40形変換細胞をパッセージ(passage)し、培養中の培地を1日毎に交換した場合(白丸)、そのままにしておいた場合(×印)2日後に培地を交換した場合(黒丸)の細胞数の変化を示す。培地を毎日交換するとSV40形変換細胞は増殖しない。これは3T3癌細胞を癌細胞とした場合と異なっている。

に加えると、有意な効果が認められなかったことを示している。

以上の結果、PNFは癌細胞増殖の初期に加えると癌細胞増殖抑制効果を示すと認識づけられる。

実験の結果

本発明物質は、選択的な抗腫瘍活性を有し、医薬品として期待される。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、実施例における培養上清のセファデックスG100カラムクロマトグラフィーの結果を示す。図中、矢印a, b, c, dおよびeは分子重量マーカーを示す。

	分子重量
a: ブロム化ナトリウム	2,000
b: クリスタリン	97,000ダルトン
c: 四重水素化アルブミン	40,000
d: チトクロームC	18,000
e: パロタン	1,500

第2図は、実施例におけるイーグルのMEM培地のセファデックスG100カラムクロマトグラフィーの結果を示す。図中、矢印a, b, c, dおよびeは第1図と同じ分子重量マーカーを示す。

第3図は、実施例におけるDEAEセファデックスA-25カラムクロマトグラフィーの結果を示す。

特開昭61- 18721 (5)

第11図は、PNFⅡのConAセファロースカラムクロマトグラフィーの結果を示す。図中、矢印はα-メチルマンノシドを含むPBSでの溶出開始時点を示す。

特許出願人 (102) 協和 発酵 工業 株式会社
代 表 者 加 藤 幹 央



第4図は、DEAEセファデックスA-25カラムクロマトグラフィーの結果をBT3細胞株細胞に与えたときの細胞数を示す。

第5図は、DEAEセファデックスA-25カラムクロマトグラフィーの結果をSV40細胞株細胞に与えたときの細胞数を示す。

第6図は、ConAセファロースで精製したPNFⅡの投与量依存性を示す。第6図は、DEAEセファデックスA-25カラムで精製したPNFⅡの投与量依存性を示す。

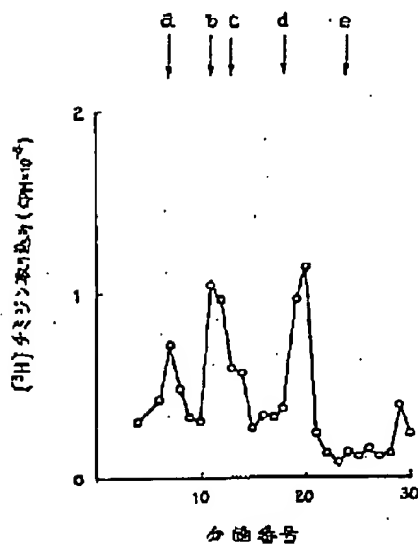
第7図は、PNFⅡをセファデックスC100カラムクロマトグラフィーにかけた結果を示す。図中、矢印d、eは第1図と同じ分子重量マーカー、fはインシュリン(5,700ダルトン)の分子重量マーカーを示す。

第8図は、SV40細胞株細胞の培養における細胞数の増加を示す。図中、矢印は培養を交換した時点を示す。

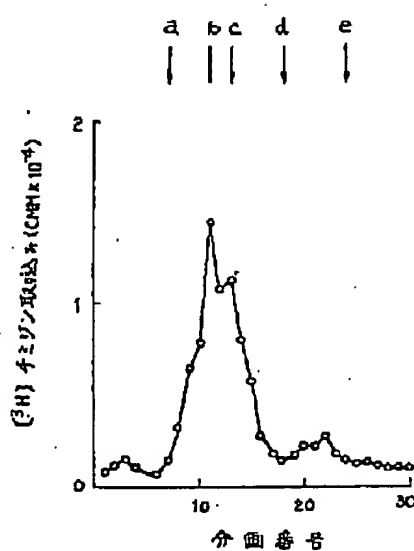
第9図は、PNFⅡによる癌細胞の抑制効果を示す。図中、矢印は培養を交換した時点を示す。

第10図は、PNFⅡのConAセファロースカラムクロマトグラフィーの結果を示す。図中矢印はα-メチルマンノシドを含むPBSでの溶出開始時点を示す。

第 1 図

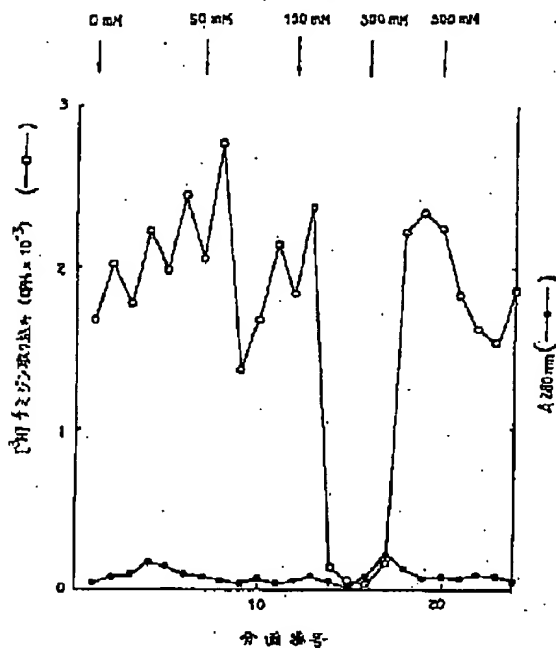


第 2 図

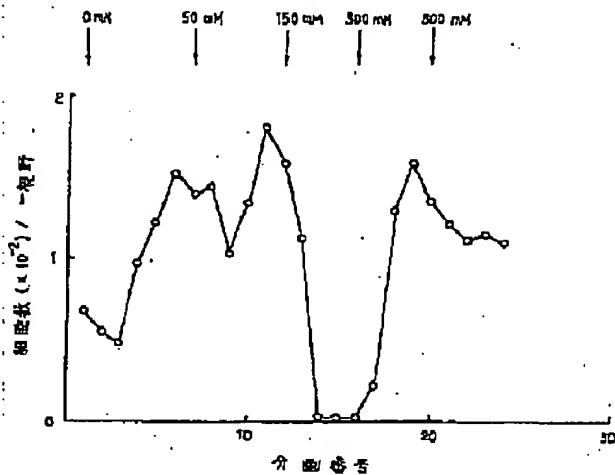


特開昭61-18721 (e)

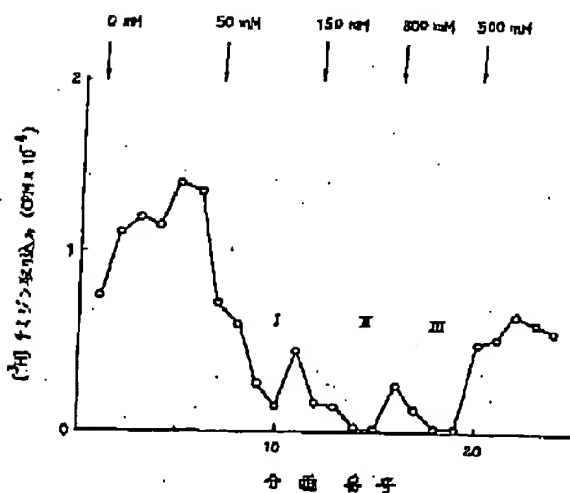
第 3 図



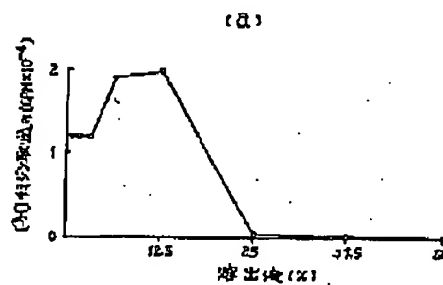
第 4 図



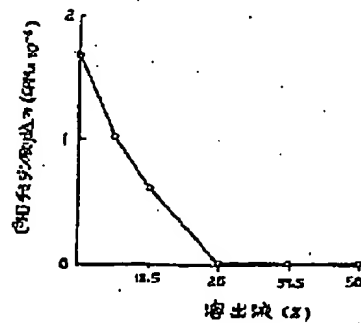
第 5 図



第 6 図

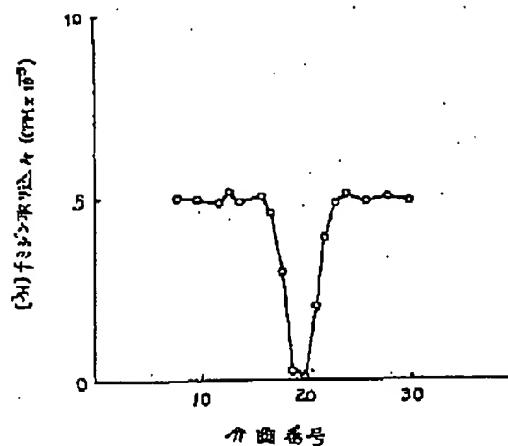


(b)

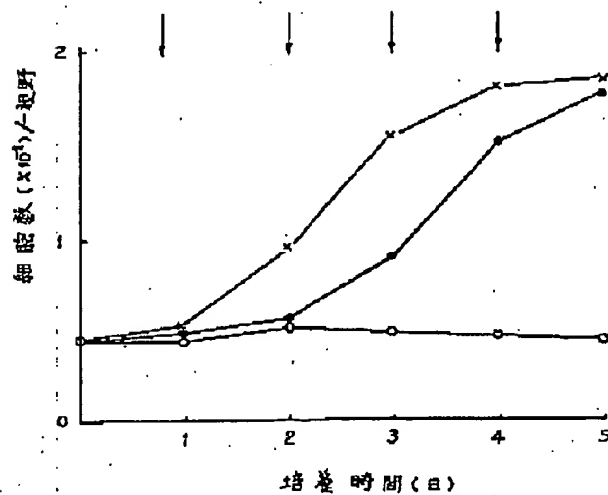


特開昭61- 18721 (7)

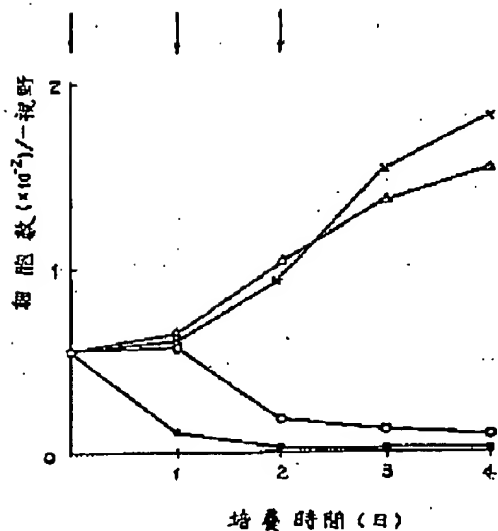
第 7 図



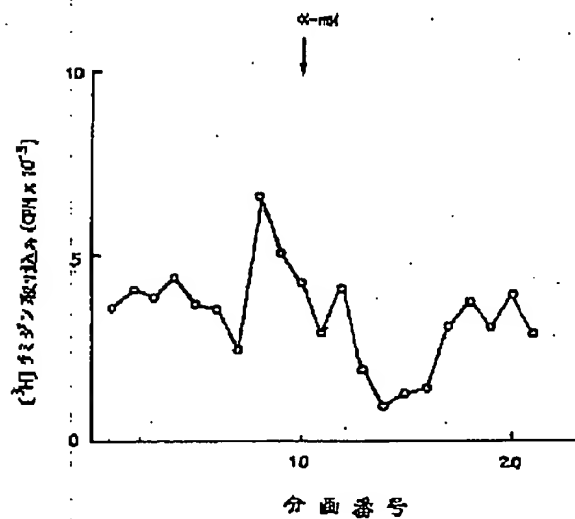
第 8 図



第 9 図



第 10 図



特開 61-18721 (8)

第 11 図

